

EP 00 / 0 9 5 8 8



REC'D 27 OCT 2000

WIPO

PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

ESU

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 46 737.4

Anmeldetag: 29. September 1999

Anmelder/Inhaber: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, München/DE

Bezeichnung: Verwendung von Gangliosiden zur Modulation
von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen

IPC: A 61 K 31/7028

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 28. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

PATENTANWÄLTE

European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL

DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 45563 0
TELEX 522 621
TELEFAX (089) 45563 999
E-MAIL email@weickmann.de

Unser Zeichen:
20597P DE/BBMDshvowr

Anmelder:
Max-Planck-Gesellschaft zur
Förderung der Wissenschaften e.V.
Hofgartenstraße 8

80539 München

Verwendung von Gangliosiden zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-
Mikrodomänen

Verwendung von Gangliosiden zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Gangliosiden zur Herstellung eines Mittels zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen.

10

15

20

25

30

Bei Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen, die auch Sphingolipid-Cholesterin-Flöße genannt werden, handelt es sich um laterale Anordnungen von spezifischen Lipiden, insbesondere Sphingolipiden einschließlich Gangliosiden und Cholesterin sowie Proteinen in Zellmembranen (K. Simons et al., Nature, Vol. 387 (1997), 569 - 572; T. Friedrichson et al., Nature, Vol. 394 (1998), 802 - 805). Es sind kleine und hochdynamische Strukturen, die durch Anziehungskräfte zwischen Sphingolipiden und Cholesterin gebildet werden. Mit den Sphingolipid-Cholesterin-Strukturen sind verschiedene Proteine assoziiert, einschließlich GPI-APs (Glykosyl-Phosphatidyl-Ankerproteine), Kinasen der Familie Src, Influenza Virus Hämagglutinin (HA) und Caveolin-1. Die meisten der mit den Sphingolipid-Cholesterin-Flößen assoziierten Proteine enthalten post-translationale Lipidmodifikationen, wobei GPI-verankerte Proteine in der Zellmembran über eine Lipideinheit verankert sind, wohingegen Kinasen der Familie Src, NO-Synthasen (NOS), HA und Caveolin acyliert sind. Die mit den Flößen assoziierten Proteine sind üblicherweise in kalten, nicht-ionischen Detergenzien, wie etwa Triton X-100, nur schlecht löslich, was möglicherweise auf ihren lipophilen Charakter zurückzuführen ist. In Triton unlösliche Komplexe wurden bezüglich ihrer Funktion als Flöße definiert, die spezifisch an bestimmten Lipiden, insbesondere Sphingolipiden einschließlich Gangliosiden, und Cholesterin, angereichert sind, während andere Lipide, wie etwa Glycerophospholipide, in den Triton-Extrakten

selektiv fehlen (Brown et al., Trends Cell Biol. 2 (1992), 338 - 343; Fiedler et al., Biochemistry 32 (1993), 6365 - 6373).

Die Existenz von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen bzw. Flößen in lebenden Zellen, insbesondere die Existenz von Mikrodomänen von GPI-verankerten Proteinen in lebenden Zellen, die durch die Verabreichung von Cholesterin beeinflusst werden können, wurde kürzlich durch einen chemischen Quervernetzungsansatz (Friedrichson et al., supra) und ein Fluoreszenz-Energietransfer-Verfahren (Varma et al., Nature 394 (1998), 798 - 802) gezeigt. Weiterhin wurde postuliert, dass die Flöße als Plattformen, an die Proteine binden können, eine wichtige Rolle bei Membrantransport- und Signalübertragungseigenschaften spielen.

Eine Aufgabe der Erfindung war es deshalb, ein Mittel zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen bereitzustellen (und zwar insbesondere deren Aufbau oder/und Eigenschaften), um auf die durch diese Mikrodomänen beeinflussten Vorgänge gezielt einwirken zu können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung von Gangliosiden zur Herstellung eines Mittels zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, dass mit Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen assoziierte Proteine, insbesondere GPI-verankerte Proteine, in den Mikrodomänen in Form von quervernetzten Clustern auf der Oberfläche von lebenden Zellen vorliegen. Durch die Zugabe von Gangliosiden wird die Quervernetzung von mit den Flößen assoziierten, insbesondere GPI-verankerten Proteinen gehemmt und darüber hinaus deren Löslichkeit in Detergenzien erhöht.

Die Verabreichung von Gangliosiden führt somit zu einer Veränderung des strukturellen Aufbaus der Mikrodomänen, sodass Ganglioside zur

Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen und den dort stattfindenden Vorgängen eingesetzt werden können.

Es wird angenommen, dass durch die Verabreichung von Gangliosiden
5 Proteine, insbesondere GPI-verankerte Proteine, aus den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen verdrängt werden, indem die Anziehungskräfte zwischen der Ankergruppe und den umgebenden Lipiden gestört werden. Dies hat zur Folge, dass die in den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen vorliegenden Proteine bei Zugabe von Gangliosiden aus ihrer Lipidumgebung
10 herausgelöst werden und nicht mehr mit den Flößen assoziiert vorliegen.

Als Folge davon verändert die Zugabe von exogenen Gangliosiden z.B. die Löslichkeit von GH-DAF (Wachstumshormon (GH; growth-hormone) verknüpft mit dem GPI-Anker des DAF (Decay accelerating factor)), einer
15 Glykosyl-Phosphatidylinositol-verankerten Wachstumshormon-Form, in Detergenzien. Es ist bekannt, dass GPI-verankerte Proteine in nicht-ionischen Detergenzien im wesentlichen unlöslich sind (Brown et al., Cell 68 (1992), 533 - 544), während eine Verringerung des Cholesteringehalts in den Zellen die Detergenz-Solubilität von GPI-APs erhöht (Cerneus et al., J.
20 Biol. Chem. 268 (1993), 3150 - 3155; Hanada et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 6254 - 6260). Dies bedeutet, dass die Wechselwirkungskräfte zwischen den Lipidbestandteilen und den Proteinen der Mikrodomänen größer als die Lösekräfte durch nicht-ionische Detergenzien sind. Werden jedoch die Mikrodomänen durch Herausnahme des Bestandteils Cholesterin
25 verändert oder zerstört, dann werden die Wechselwirkungskräfte zwischen den Lipiden und den Proteinen verringert und die Proteine können durch nicht-ionische Detergenzien aus den Flößen herausgelöst werden.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass bei Zugabe von
30 Gangliosiden, die ebenfalls einen Lipidbestandteil der Flöße darstellen, das Gegenteil zutrifft, dass also die Zugabe von Gangliosiden zu Zellen die Detergenz-Solubilität von GH-DAF erhöht. Diese Feststellung ist unerwartet,

da man annehmen würde, dass eine Erhöhung der Konzentration eines in den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen vorkommenden Lipids eine Stabilisierung dieser Domänen bewirken würde. Tatsächlich stört die Zugabe von Gangliosiden jedoch das Quervernetzen der Proteine und erhöht die Detergenz-Solubilität von GH-DAF. Ganglioside bewirken somit eine Modulation der Mikrodomänen, insbesondere eine Verdrängung von Proteinen, insbesondere GPI-APs aus den Flößen.

Dies wird dadurch bestätigt, dass Ganglioside das Copatching von HA und GH-DAF stören. Das Copatching von zwei Mikrodomänkomponenten ist eine Folge der Koaleszenz einer gemeinsamen Lipidmikrodomäne.

Die Modulation der Mikrodomänen durch die Ganglioside erfolgt bevorzugt spezifisch und reversibel, d.h. bei Wegnahme der Ganglioside wird wieder die ursprüngliche, unveränderte Struktur der Mikrodomänen erhalten.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird also durch die Verwendung von Gangliosiden die Lokalisierung von Proteinen auf Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen beeinflusst, insbesondere die Lokalisierung von Ankerproteinen, acylierten Proteinen, Src-Kinasen oder/und Cholesterin-oder GPI-verankerten Proteinen. Durch die Zugabe von Gangliosiden wird die Anordnung von in Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen vorliegenden Proteinen verändert, was zu einer Modulation oder/und Veränderung der Struktur oder/und des Aufbaus der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen führt. Besonders bevorzugt wird ein Clusterabbau der Proteine bewirkt.

Die erfindungsgemäß verwendeten Gangliosiden werden bevorzugt ausgewählt aus Rinderhirngangliosiden, GM₁, GD1a, GD1b, GD3, GM2, GM3, GQ1a, GQ1b oder/und Globosiden. Besonders bevorzugt werden exogene Ganglioside verwendet, die bereits Bestandteil der zu behandelnden Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen sind.

Unter den Begriff "Modulation" fällt erfindungsgemäß jede strukturelle und chemische Veränderung der Mikrodomänen, insbesondere eine Veränderung im strukturellen Aufbau oder/und in der Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile der Mikrodomänen. Die Modulation der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen ihrerseits bewirkt bevorzugt eine Veränderung der Membrantransport-, Signalübertragungs- und/oder Zelladhäsionseigenschaften und/oder eine Veränderung von enzymatischen Prozessen. Diese Wirkungen werden durch die Verwendung von Gangliosiden zur Modulation, also insbesondere zur Veränderung der Struktur von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen hervorgerufen. So können durch eine Veränderung der Sphingolipid-Cholesterin-Flöße durch exogen zugegebene Ganglioside Signalübertragungseigenschaften beeinflusst werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Zugabe von Gangliosiden zu Zellen den Autophosphorylierungsgrad vieler Kinasen verändert. Die Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen stellen somit Plattformen für verschiedene Prozesse, insbesondere für Signalübertragungsvorgänge dar, die erfindungsgemäß durch Modulation der Mikrodomänen mit Gangliosiden beeinflusst werden können.

GPI-verankerte Proteine assoziieren z.B. mit Tyrosinkinasen der Src-Familie (Brown, Trends Cell Biol. 2 (1992), 338 - 342). Zusätzlich sind in den Caveolae, Plasmamembraneinbuchtungen, die beim Sequestern und Organisieren von Floß-Lipiddomänen involviert sind, Zellsignalproteine konzentriert. Viele Signalübertragungsmoleküle sind mit Sphingolipid-Cholesterin-Flößen oder Caveolae assoziiert, wie etwa PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), Proteinkinase C und der Insulinrezeptor. Die durch diese Moleküle vermittelten Signalübertragungswege können durch die exogene Zugabe von Gangliosiden gehemmt werden. Es wurde nun festgestellt, dass durch Ganglioside diese Signalübertragungswege moduliert werden, indem z.B. ein Clusterabbau von Protein enthaltenden Mikrodomänen, insbesondere von GPI-AP enthaltenden Mikrodomänen bewirkt wird.

Von der Anordnung von Lipid- und Proteinkomponenten in den Flößen hängen noch weitere Signalübertragungsvorgänge ab. Eine Modulation, insbesondere ein Abbau von Flößen durch exogene Verabreichung von Gangliosiden kann z.B. bewirkt werden, um eine Mikrodomänen-abhängige Signalübertragung zu antagonisieren. Zu diesen Signalübertragungsvorgängen gehören u.a. ein Antikörper induziertes Patching von GPI-verankerter PLAP (placental alkaline phosphatase), was zu einer Akkumulation der Src-ähnlichen Tyrosinkinase fyn führt (Harder et al., J. Cell. Biol. 141 (1998), 929 - 942). Weiterhin wurden physiologische Reaktionen, die durch Mikrodomänen-Cluster induziert werden, für Lymphozyten beschrieben (Brown, Curr. Opin. Immunol. 5 (1993), 349 - 354). So führt ein Antikörper-induziertes Quervernetzen von GPI-verankerten Proteinen zur Aktivierung von T-Lymphozyten (Thomas et al., J. Biol. Chem. 267 (1992), 12317 - 12322) und das Quervernetzen des IgE-Rezeptors FcεRI verursacht eine allergische Reaktion einschließlich einer Sekretion von Histamin in Mastzellen (Holowka et al., Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 25 (1996), 73 - 80; Field et al., J. Biol. Chem. 272 (1997), 4276 - 4280). Weiterhin können Ganglioside zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden, die mit einer Zellbewegung in Zusammenhang stehen, wie etwa die Bekämpfung von Tumoren bzw. Metastasen. Tumorzellen nutzen den oben genannten Mechanismus, um der Immunantwort zu entkommen. Durch Flöße vermittelte Prozesse können somit durch Ganglioside beeinflusst werden, wie etwa die T-Zellen-Aktivierung in Gegenwart von Tumorzellen. Durch den erfindungsgemäßen Einsatz von Gangliosiden ist es möglich, Funktionen, die von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen beeinflusst werden, zu modulieren und damit gezielt zu beeinflussen.

Weiterhin wurde festgestellt, dass bei der Zugabe von Gangliosiden zu Zellen ein Anstieg der Autophosphorylierung von verschiedenen Proteinkinasen beobachtet werden kann.

Darüber hinaus können die Ganglioside als Mittel zur Aufklärung der Pathogenese von Erkrankungen verwendet werden, die mit Aktivitäten an Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen assoziiert sind. So wurde kürzlich gezeigt, dass eine Verringerung des Cholesterins von Hippocampus-Neuronen die Sekretion des β -Amyloidpeptids hemmt, woraus sich ergibt, dass die Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen eine wichtige Rolle bei der proteolytischen Verarbeitung des Amyloidvorläuferproteins (APP) bei der Alzheimer'schen Erkrankung spielen (Simons et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998), 6460 - 6464). Die Transformation des GPI-verankerten Prionproteins zur Scrapie-Proteinisoform wurde ebenfalls mit Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen in Verbindung gebracht (Taraboulos et al., J. Cell Biol. 129 (1995), 121 - 132). Bevorzugt werden deshalb die Ganglioside derart verwendet, dass die Modulation der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen eine Veränderung der Proteolyse des Amyloid-Vorläuferproteins der Alzheimer-Erkrankung oder eine Modifikation eines Prionproteins bewirkt.

Die erfindungsgemäße Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen kann sowohl für therapeutische, präventive als auch diagnostische Zwecke von Interesse sein. Die Ganglioside werden dabei bevorzugt in einer Dosis von 3, bevorzugt von mindestens 5 bis zu 30 und bevorzugt bis zu 20 mg pro kg pro Tag verabreicht.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und die beigefügten Figuren weiter erläutert.

Figur 1

zeigt, dass Ganglioside das Quervernetzen von GPI-verankerten Proteinen, insbesondere von GH-DAF in lebenden Zellen hemmen. MDCK GH-DAF-Zellen (MDCK: dog, Cocker Spaniel, kidney) wurden mit 0, 10, 50 und 100 μ M GM₁ (A) oder mit 10, 50 und 100 μ M bbG (B) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. CHO FR-GPI-Zellen wurden mit 100 μ M bbG oder mit 100 μ M

GM₁ für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit BS³ quervernetzt. Die Proteine wurden mit 5 - 15 % SDS-PAGE getrennt und nach Western Blotten mit einem Anti-GH-Antikörper, gefolgt von ECL (Elektrochemolumineszenz) nachgewiesen. Die Autoradiographen wurden gescannt und die Intensität des immunoreaktiven Signals ist als relative optische Dichte (ROD) für 0 µM GM₁ (A, obere Kurve), 0 µM bbG (B, obere Kurve), 100 µM GM₁ (A, untere Kurve) und 100 µM bbG (B, untere Kurve) dargestellt.

Figur 2

zeigt, dass Ganglioside das Quervernetzen von FR-GPI in CHO-Zellen hemmen. CHO FR-GPI-Zellen wurden mit 100 µM bbG oder mit 100 µM GM₁ für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit BS³ quervernetzt. Die Proteine wurden mit 5 - 15 % SDS-PAGE getrennt und nach Western Blotten mit einem Anti-Folatrezeptor-Antikörper, gefolgt von ECL (Elektrochemolumineszenz) nachgewiesen.

Figur 3

zeigt die Inkorporation von GM₁ in die Plasmamembran von MDCK GH-DAF-Zellen. In (A) wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit 1 µCi/ml Tritium enthaltendem GM₁ bei einer Gangliosid-Endkonzentration von 100 µM für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit BSA (Rinderserumalbumin) für 0, 10, 20, 30 oder 45 Minuten (schraffierte Balken) gewaschen. Die additive Wirkung einer Behandlung mit 0,1 % Trypsin für 5 Minuten bei 37°C nach dem Waschen mit BSA ist als ausgefüllte Balken gezeigt. In (B) wurde das Quervernetzen nach Inkubieren von GM₁-beladenen Zellen mit BSA für 0, 10, 20, 30 oder 45 Minuten durchgeführt. SDS-PAGE, Western-Blotting und Nachweis wurden wie in Figur 1 beschrieben durchgeführt.

Figur 4

zeigt den Anstieg der Detergenz-Solubilität von GH-DAF durch Ganglioside. In (A) wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit 100 μ M bbG für 1 Stunde bei 37°C oder mit 100 μ M NBD-C₆-HPC für 1 Stunde bei 8°C; mit 100 μ M GM₁ für 1 Stunde bei 37°C oder mit 100 μ M bbG für 1 Stunde beladen, gefolgt von einer 6stündigen Inkubation mit DMEM enthaltendem Serum (A) oder einer Behandlung mit 10 mM Methyl- β -cyclodextrin für 1 Stunde bei 37°C oder einer Inkubation mit Anti-GH für 1 Stunde bei 12°C, gefolgt von einer Inkubation mit einem sekundären Antikörper (B). Die Zellen wurden mit Triton X-114 für 30 Minuten bei 4°C extrahiert, zentrifugiert und das GH-DAF in der löslichen (S) und unlöslichen (I) Fraktion wurde wie unten beschrieben nachgewiesen.

Figur 5

zeigt, dass die Wirkung von Octylglukosid auf Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen von der Wirkung von Gangliosiden verschieden ist. MDCK GH-DAF-Zellen wurden für 1 Stunde mit 5 und 10 mM Octylglukosid inkubiert und mit BS³ quervernetzt. Eine leichte Abnahme der Quervernetzung wurde nur bei der Verwendung von 10 mM Octylglukosid beobachtet. Bei allen untersuchten Konzentrationen blieben die Membranen intakt.

Figur 6

zeigt, dass die Hemmung der Quervernetzung von GH-DAF eine spezifische Eigenschaft von Gangliosiden ist. In (A) wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit 0, 10, 50 oder 100 μ M NBD-C₆-HPC für 30 Minuten bei 8°C inkubiert, bevor sie mit BS³ quervernetzt wurden. SDS-PAGE, Western-Blotting und Nachweis wurden wie in Figur 1 beschrieben durchgeführt. In (B) wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit 0 oder 100 μ M bbG für 1 Stunde inkubiert, gefolgt von einer 6stündigen Inkubation mit einem Medium enthaltenden

Serum (DMEM/FCS). Die Zellen wurden quervernetzt, gefolgt von SDS-PAGE, Western-Blotting und Nachweis, wie in Figur 1 ausgeführt.

Figur 7

5 zeigt, dass eine Gangliosidbehandlung das Immunfluoreszenzmuster von GH-DAF nicht verändert. MDCK GH-DAF-Zellen wurden ohne (A, D), mit 100 μ M bbG (B) bzw. mit 10 mM CD (C) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Anti-GH-Antikörper gefolgt von einem Cy3-konjugierten Anti-Schaf-IgG (A, B und C) markiert oder vor der
10 Fixierung Antikörper-induziert quervernetzt.

Figur 8

zeigt, dass die Beladung von MDCK GH-DAF-Zellen mit Gangliosiden den Autophosphorylierungsstatus verändert. MDCK GH-DAF-Zellen wurden mit
15 bbG oder GM₁ für 1 Stunde bei 37°C beladen oder mit 0,5 mM BS³ für 45 Minuten bei 4°C quervernetzt. Nach einer Lyse wurden Aliquots der Proben auf einem 5 - 15 % Gel getrennt und es wurde der In-Gel-Assay für die Proteinkinaseaktivität durchgeführt. Banden, bei denen die Intensität bei der Gangliosidbehandlung anstieg, sind mit einem Pfeil markiert. Banden, die nur
20 nach einer Gangliosidbeladung sichtbar wurden, sind mit einem Pfeilkopf markiert.

Figur 9

zeigt die Hemmung des Copatching von Influenza HA und GH-DAF durch
25 Ganglioside. MDCK GH-DAF-Zellen wurden mit dem Influenza HA-Virus infiziert und dann mit DMEM (A-F) oder 100 μ M GM₁ in DMEM (G-L) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einer anschließenden Behandlung mit einem Gemisch von monoklonalen Anti-HA-Maus- und polyklonalen Anti-GH-Schaf-Antikörpern bei 4 °C wurde das Patching unter Verwendung von
30 markierten sekundären Cy-3-Anti-Schaf (rot)- und FITC-Anti-Maus (grün)-Antikörpern nachgewiesen. Die Panels in der linken Spalte zeigen die Verteilung von GH, in der mittleren Spalte die Verteilung von HA und in der

rechten Spalte die Kombination beider Signale. Die Panels D-F zeigen jeweils ein Detail der Panels A-C, wohingegen die Panels J-L ein Detail der Panels G-I zeigen. Die Striche in F und L entsprechen $2 \mu\text{M}$, die in C und I $8 \mu\text{M}$.

5

Beispiele

Beispiel 1

Inhibition der Quervernetzung von GPI-verankerten Proteinen durch exogene Verabreichung von Gangliosiden

10

15

20

Zur Analyse der Organisation von GPI-verankerten Proteinen auf der Oberfläche wurde eine MDCK-Zelllinie verwendet, die permanent GH, fusioniert an den GPI-Anker des Zerfallbeschleunigungsfaktors (GH-DAF; decay accelerating factor) exprimiert (Friedrichson et al., Nature 394 (1998), 802 - 805). Die MDCK GH-DAF-Zellen wurden bei 37°C in 5 % CO_2 in DMEM, ergänzt mit 10 % FCS und Antibiotika gelagert. Die Experimente wurden auf konfluenten oder subkonfluenten Zellen durchgeführt, die in Kunststoffschalen gezüchtet wurden. Wenn MDCK GH-DAF-Zellen chemisch mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS^3) quervernetzt wurden, wurde eine deutliche Bande bei 46 kDa (Dimer) und eine verschmierte Bande, die von 60 kDa bis zu 300 kDa reichte, durch Western-Blotten nachgewiesen (Figur 1A).

25

30

Um den Einfluss von Gangliosiden auf Sphingolipid-Cholesterin-Flöße zu untersuchen, wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von GM_1 für 1 Stunde in einem serumfreien Medium bei 37°C beladen und mit BS^3 quervernetzt. Wie man in Figur 1A sehen kann, verringerte eine Behandlung von MDCK GH-DAF-Zellen mit GM_1 die Menge an quervernetztem GH-DAF signifikant. Die Quantifizierung der immunoreaktiven Banden ergab, dass $73 \% \pm 6 \%$ von GH-DAF Oligomere in unbehandelten Zellen bildete, während $65 \% \pm 7 \%$, $57 \% \pm 7 \%$ und $49 \% \pm 7 \%$ von GH-DAF in quervernetzten Spezies in Zellen gefunden, die

mit 10, 50 bzw. 100 μM GM_1 behandelt wurden. Eine Inkubation der Zellen mit Rinderhirngangliosiden (bbG) inhibierte ebenfalls effizient die Bildung von GH-DAF-Oligomeren (Figur 1B). Bei der Verwendung von 100 μM bbG betrug die Quervernetzungseffizienz $51 \% \pm 5 \%$, verglichen mit $73 \% \pm 6 \%$ in unbehandelten Zellen.

Um festzustellen, ob die Fähigkeit von Gangliosiden GPI-AP enthaltende FlöÙe aufzulösen, unabhängig vom Zelltyp ist, wurden CHO-Zellen, die permanent den GPI-verankerten Folatrezeptor (FR-GPI) exprimieren, in der gleichen Weise behandelt. Die CHO FR-GPI-Zellen wurden in einem Folatfreien Hams F-12-Medium gezüchtet, das 5 % FCS, Hygromycin (100 $\mu\text{g/ml}$), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) enthielt. Das Quervernetzen von CHO FR-GPI-Zellen mit BS^3 führt zum Auftreten von quervernetzten Produkten von FR-GPI, wobei eine Quervernetzungseffizienz von $28 \% \pm 3 \%$ beobachtet wurde. Wenn CHO FR-GPI-Zellen mit 100 μM GM_1 oder 100 μM bbG vor dem Quervernetzen beladen wurden, wurde die Quervernetzungseffizienz auf $2,7 \% \pm 2,5 \%$ bzw. $3,3 \% \pm 2 \%$ verringert (siehe Figur 2).

Um die Menge an GM_1 zu quantifizieren, die in die Plasmamembran inkorporiert wird, wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ Tritium enthaltendem GM_1 bei einer Gangliosidkonzentration von 100 μM für 1 Stunde inkubiert. Hierzu wurde GM_1 extrahiert, gemäß bekannten Verfahren gereinigt (Tettamanti et al., Biochim. Biophys. Acta 296 (1973), 160 - 170) und am C-3 der Langkettenbasengruppe radiomarkiert (Sonnino et al., J. Lipid Res. 25 (1984), 620 - 629). Die Homogenität der radioaktiven Verbindung $^3\text{H-GM}_1$ betrug über 99 % und ihre spezifische Radioaktivität betrug 1,31 Ci/mmol. Die Zellen wurden für 1 Stunde in DMEM, das 1 $\mu\text{Ci/ml}$ des Tritium enthaltenden GM_1 bei einer Gangliosidkonzentration von 100 μM enthielt, inkubiert, mit PBS/BSA gewaschen und anschließend für 0 bis 45 Minuten mit PBS/BSA bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann für 5 Minuten bei 37°C mit 1 ml PBS, das 0,1 % Trypsin enthielt,

behandelt. Die Zelllysate wurden hinsichtlich des radioaktiven Gangliosidgehalts mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckmann Instruments, CA) analysiert. Das Protein wurde unter Verwendung eines Protein Assay Reagents (BCA; Pierce, UK) bestimmt.

5

Nur etwa 0,7 % des exogen zugegebenen Gangliosids assoziierte mit den Zellen. Etwa 35 % des gesamten assoziierten GM₁ konnte durch Inkubation der Zellen mit einer BSA-Lösung entfernt werden (Figur 3A). Durch eine nachfolgende Behandlung der Zellen mit Trypsin konnten zwei Pools von assoziiertem GM₁ nachgewiesen werden. Etwa 30 % des verbleibenden GM₁ wurde durch eine Trypsinbehandlung freigesetzt (Trypsin-labiler Pool) und etwa 70 % war beständig (Trypsin-stabiler Pool) (Figur 3A). Es wird angenommen, dass der Trypsin-stabile Pool von GM₁ den Molekülen entspricht, die in die Plasmamembran eingefügt sind, wohingegen der Trypsin-labile Pool aus Gangliosiden besteht, die mit Proteinen wechselwirken, die aus der Plasmamembran herausstehen (vgl. Masserini et al., Biochemistry 29 (1990), 697 - 701; Saqr et al., J. Neurochem. 61 (1993), 495 - 411). Der Trypsin-stabile Pool von GM₁ enthielt diejenige Fraktion angereichert, die gegenüber einer Extraktion mit Triton X-100 bei 4 °C beständig war. Nach einer Inkubation von Zellen mit 100 µM Tritium enthaltendem GM₁ wurden 3,74 nMol GM₁ (pro mg Protein) in der Detergenz-unlöslichen Fraktion gefunden, während 1,26 nMol GM₁ aus der löslichen Fraktion gewonnen wurden, was zeigt, dass sich exogenes GM₁ in den Flößen ansammelt.

25

Um auszuschließen, dass die Inhibition der Quervernetzung von GH-DAF aufgrund der Wirkung von Iose mit der Oberfläche assoziierten Gangliosiden stattfindet, wurde das Quervernetzen an GM₁-beladenen Zellen vor und nach der Inkubation mit BSA durchgeführt. Die Quervernetzungseffizienz blieb unter diesen zwei Bedingungen die gleiche (siehe Figur 3B, die Variation der Effizienz war kleiner als 5 % bei allen Bedingungen). Somit sind Ganglioside, die mit der Membran fest assoziiert sind, für die Inhibition

30

der Quervernetzung verantwortlich. Es wurde festgestellt, dass 70 % des fest assoziierten GM₁ in die Doppelschicht inkorporiert wurden gemäß dem von anderen Autoren verwendeten Kriterium (Kanda et al., J. Biochem. (Tokyo) 91 (1982), 1707 - 1718; Schwarzmann et al., Biochemistry 22 (1983), 5041 - 5048). Der Anteil des Trypsin-labilen Pools am Quervernetzen ist somit, falls er überhaupt auftritt, sehr gering, insbesondere da die Löslichkeit von GH-DAF in TX-114 durch Ganglioside beträchtlich erhöht wurde. Dieses Verhalten kann mit an hervorstehenden Proteine bindenden Gangliosidmicellen nicht erklärt werden.

Beispiel 2

Veränderung der Detergenz-Solubilität von GH-DAF durch Ganglioside

Ein oftmals verwendetes Kriterium zur Untersuchung der Assoziation eines Proteins an Mikrodomänen ist seine Extraktionsbeständigkeit gegenüber nicht-ionischen Detergenzien, wie etwa Triton X-100 bei 4°C (Brown et al., Cell 68 (1992), 533 - 544). Es wurde deshalb die Detergenz-Solubilität von GH-DAF nach einer Gangliosidbeladung der Zellen untersucht. Es wurde gefunden, dass die Löslichkeit von GH-DAF in TX-114 signifikant von 51 ± 4 % auf 83 % ± 10 % bzw. 76 % ± 8 % in mit GM₁ bzw. bbG beladenen Zellen erhöht wurde (Figur 4A).

Durch diese Ergebnisse wurde gezeigt, dass Ganglioside, die in die Plasmamembran eingefügt werden, GPI-APs aus Lipidmikrodomänen verdrängen. Eine Beeinflussung, insbesondere Hemmung der Quervernetzung durch sterische Hinderung durch Ganglioside, die an aus der Oberfläche der Plasmamembran hervorstehende Proteine gebunden sind, tritt somit nicht oder nur zu einem sehr geringen Teil auf. Es ist bekannt, dass eine Verringerung des Cholesterins in Zellmembranen die Löslichkeit von GPI-APs in nicht-ionischen Detergenzien erhöht (Cerneus et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 3150 - 3155; Hanada et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 6254 - 6260; Scheiffele et al., EMBO J. 16 (1997), 5501 - 5508). Die

Löslichkeit von GH-DAF wurde bei einer TX-114 Extraktion auf $80 \% \pm 7$ % nach einer Extraktion des Membrancholesterins mit CD verschoben (Figur 4B). Im Gegensatz dazu verringert eine Stabilisierung der Mikrodomänen durch ein Antikörper-induziertes Quervernetzen die Solubilität von GH-DAF auf $34 \% \pm 7 \%$ (Figur 4B).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Modulation oder Veränderung des Lipidgehalts der zellulären Membran durch Verwendung von exogenen Gangliosiden sowohl das Clusterverhalten von GPI-APs als auch die Solubilisierung in TX-114 bei 4°C moduliert.

Beispiel 3

Wirkung von Gangliosiden auf Mikrodomänen

Wie oben gezeigt wurde, werden GPI-APs durch Beladen von MDCK-GH-DAF-Zellen mit Gangliosiden aus den Flößen verdrängt. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass diese Wirkung teilweise aufgrund von detergenzartigen Eigenschaften von Gangliosiden auftreten, wurde n-Octyl- β -D-glukopyranosid (OG) eingesetzt. Dieses Detergenz ähnelt chemisch den Gangliosiden (es enthält beispielsweise eine Kohlenhydrat-Kopfgruppe) und es ist bekannt, dass es GPI-APs vollständig solubilisiert, wenn es oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration (20 - 25 mM) verwendet wird. MDCK GH-DAF-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von OG inkubiert und mit BS³ quervernetzt. Unter Verwendung der gleichen Konzentrationen von OG wie von den Gangliosiden (10 - 100 μM) wurde kein Einfluss auf das Quervernetzen von GH-DAF beobachtet. Selbst wenn Zellen mit einer 100fach höheren Konzentration an OG (10 mM) inkubiert wurden, wurde nur eine geringfügige Inhibition der Quervernetzung beobachtet (Figur 5; die Inhibition betrug $3,5 \% \pm 0,7 \%$). Bemerkenswerterweise blieben selbst unter dieser Bedingung die Membranen intakt, da Caveolin-1, ein Proteinmembran, das sowohl N- als auch C-Termini zum Cytoplasma hin angeordnet aufweist, nicht quervernetzt wurde. Nur wenn OG oberhalb

seiner kritischen Mizellkonzentration (20 mM) verwendet wurde, wurde Caveolin-1 als quervernetztes Produkt mit hohem Molekulargewicht gefunden. Die Behandlung der MDCK GH-DAF-Zellen mit 100 μ M GM₁ führte nicht zum Quervernetzen von Caveolin-1. Diese Daten zeigen, dass
5 die Inhibition der Quervernetzung von GH-DAF durch Ganglioside nicht aufgrund einer Solubilisierung der Membran durch detergenzartige Eigenschaften der Ganglioside auftritt.

Beispiel 4

Inhibition der Quervernetzung von GH-DAF mit Gangliosiden

In diesem Beispiel wird gezeigt, dass die Inhibition des Clusters von GPI-verankerten Proteinen eine spezifische Eigenschaft von Gangliosiden ist. Ein Lipid, das kein Bestandteil der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen ist,
15 sollte keinen Einfluss auf das Quervernetzen und die Löslichkeit von GH-DAF zeigen. Günstigerweise sollten für einen solchen Kontrollversuch Phosphatidylcholinmoleküle verwendet werden, wie etwa solche die in Zellmembranen vorkommen. Diese Lipide können jedoch nicht durch exogene Zugabe in die Membran eingebracht werden. Für diesen Zweck
20 wurden deshalb MDCK GH-DAF-Zellen mit einem partiell wasserlöslichen fluoreszenzmarkierten Analogon von Phosphatidylcholin (NBD-C₆-HPC) inkubiert. Es ist bekannt, dass NBD-C₆-Lipide bei geringer Temperatur schnell zur Plasmamembran gelangen und ihre Akkumulation in der Plasmamembran kann durch Immunofluoreszenzmikroskopie leicht
25 beobachtet werden (Kean et al., J. Cell. Biol. 123 (1993), 1403 - 1419). Es wurde nun die Detergenzunlöslichkeit von NBD-C₆-HPC untersucht. Zellen wurden mit NBD-C₆-HPC beladen und es wurde eine Detergenzextraktion bei 4°C mit Triton X-114 durchgeführt. Mehr als 99 % des NBD-C₆-HPC wurde aus der Detergenz-löslichen Fraktion gewonnen, was anzeigt, dass das Lipid
30 nicht mit den Mikrodomänen assoziiert vorliegt. Es wurde keine Veränderung im Quervernetzungsmuster nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an NBD-C₆-HPC beobachtet. Die Quervernetzungseffizienz

betrug $73 \% \pm 5 \%$ in mit $100 \mu\text{M}$ NBD- $\text{C}_6\text{-HPC}$ behandelten Zellen im Vergleich zu $73 \% \pm 6 \%$ in Kontrollzellen (Figur 6A). Auch die Löslichkeit von GH-DAF ($54 \% \pm 2 \%$ löslich) wurde durch NBD- $\text{C}_6\text{-HPC}$ nicht verändert (Figur 4A).

5

Um festzustellen, ob die Hemmung der Quervernetzung von GH-DAF durch Ganglioside reversibel ist, wurden MDCK GH-DAF-Zellen mit $100 \mu\text{M}$ bbG beladen und anschließend für 6 Stunden in einem Serum enthaltenden Medium vor dem Quervernetzen inkubiert. Wie in Figur 6B gezeigt, waren 6 Stunden Inkubation mit einem Serum enthaltenden Medium ausreichend, um nahezu vollständig das Quervernetzungsmuster von GH-DAF wieder herzustellen. Die Quervernetzungseffizienz war $6 \% \pm 1 \%$ geringer als bei Kontrollzellen.

10

15

Die Detergenzunlöslichkeit von GH-DAF in TX-114 wurde durch Inkubation von bbG-beladenen Zellen mit einem Serum enthaltenden Medium für 6 Stunden ebenfalls wieder hergestellt ($61 \% \pm 4 \%$ löslich) (Figur 4A).

20

Dieses Beispiel zeigt, dass die Inhibition der Quervernetzung von GH-DAF mit Gangliosiden spezifisch und reversibel ist.

Beispiel 5

Die Verteilung von GH-DAF wird durch Ganglioside nicht verändert

25

Bei Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen oder Flößen handelt es sich um kleine und hochdynamische Strukturen, die durch herkömmliche mikroskopische Techniken nicht aufgelöst werden können. Es wurde untersucht, ob ein Beladen der Zellen mit Gangliosiden zu einer globalen Umordnung der Plasmamembran und somit der GPI-APs führt. Die Verteilung von GH-DAF auf MDCK-Zellen mit oder ohne Beladung mit bbG wurde durch Immunofluoreszenzmarkierung analysiert. Um eine Umverteilung von GH-DAF nach der Fixierung zu verhindern, wurde eine

30

Formaldehydfixierung kombiniert mit einer anschließenden Methanolfixierung verwendet (Harder et al., J. Cell Biol. 141 (1998), 929 - 942). Die Inkubation der Zellen mit 100 μ M bbG für 1 Stunde vor der Fixierung und die Antikörpermarkierung hatten keinen Einfluss auf die diffuse Verteilung von GH-DAF auf der Zelloberfläche (Figur 7A und B). Die intrazelluläre Färbung stammt von der Anordnung des Proteins im Golgi und/oder der endosomalen Anordnung. Eine Verringerung des Membrancholesterins mit 10 mM CD führte ebenfalls nicht zu nachweisbaren Veränderungen in der Verteilung von GH-DAF (Figur 7C). Im Vergleich hierzu führte die Zugabe von Antikörpern gegen GH-DAF vor der Fixierung zu einer fleckenartigen Verteilung des Immunofluoreszenzsignals (Figur 7D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition der Quervernetzung durch Ganglioside nicht aufgrund einer Umlagerung der Membran auftritt.

Beispiel 6

Beladen der Zellen mit Gangliosiden verändert den Autophosphorylierungszustand von Proteinkinasen

Dieses Beispiel zeigt, dass eine Korrelation zwischen der Verabreichung von Gangliosiden zu MDCK GH-DAF-Zellen und Zellsignalübertragungsvorgängen besteht. Als Anzeige einer Signalübertragung wurde der Autophosphorylierungszustand von Zellproteinkinasen nach einer Gangliosidbeladung von Zellen unter Verwendung eines In-Gel-Assays gemessen. Die Bedingungen für die Gangliosidbeladung waren die gleichen wie für die Untersuchungen zur Quervernetzung. Wie man aus Figur 8 sehen kann, stieg nach Zugabe von Gangliosiden die Intensität von verschiedenen Banden signifikant an (Pfeil), während andere Banden nur nach einer Gangliosidbehandlung sichtbar wurden (Pfeilköpfe). Hier ist zu beachten, dass ein chemischen Quervernetzen mit BS³ alleine nicht zu signifikanten Veränderungen des Autophosphorylierungszustands führt. Diese Versuche zeigen, dass Ganglioside neben einer Modulation der

Assoziation von GPI-verankerten Proteinen an Mikrodomänen
Signalübertragungsvorgänge in MDCK-Zellen induzieren können.

Beispiel 8

5 Inhibition des Copatching von Influenza HA und GH-DAF durch Ganglioside

Bei Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen handelt es sich um kleine und hochdynamische Strukturen, die durch herkömmliche mikroskopische Techniken nicht aufgelöst werden können. Es wurde untersucht, ob ein Beladen der Zellen mit Gangliosiden zu einer Umverteilung von GPI-APs führt. Die Verteilung von GH-DAF auf MDCK-Zellen mit oder ohne Beladung mit bbG wurde durch Immunofluoreszenzmarkierung analysiert. Um eine Umverteilung von GH-DAF nach der Fixierung zu verhindern, wurde eine Formaldehydfixierung kombiniert mit einer anschließenden Methanolfixierung
10 verwendet (Harder et al., J. Cell. Biol. 141 (1998) 929-942). Die Inkubation der Zellen mit 100 μ M bbG für 1 Stunde vor der Fixierung und die Antikörpermarkierung hatten keinen Einfluss auf die diffuse Verteilung von GH-DAF auf der Zelloberfläche (Figur 8, Panelen A und B). Die intrazelluläre Färbung stammt von der Anordnung des Proteins im Goigi und/oder der
15 endosomalen Anordnung. Eine Verringerung des Membrancholesterins mit 10 mM CD führte ebenfalls nicht zu nachweisbaren Veränderungen in der Verteilung von GH-DAF (Figur 7 C). Im Vergleich dazu führte die Zugabe von Antikörpern gegen GH-DAF vor der Fixierung zu einer Patch-artigen Verteilung des Immunofluoreszenzsignals (Figur 7 D).

25 Das gleichzeitige Inkubieren von lebenden Zellen mit Antikörpern gegen mit den Mikrodomänen assoziierten Proteinen führt zur Umverteilung der unabhängig quervernetzten Komponenten in überlappende Patches. Ein Copatching wird aber nur für Floßmarker-Paare beobachtet, nicht für Paare
30 bestehend aus einem Floß-Marker und einem nicht-Floß-Marker, woraus man schließen kann, daß Anziehungskräfte in der gemeinsamen Lipidumgebung von Floß-Proteinen vorhanden sind.

Es wurde nun untersucht, ob die exogene Verabreichung von Gangliosiden die physikalische Verbindung von GH-DAF an Lipidmikrodomänen stört. Als einen mit den Mikrodomänen assoziierten Proteinmarker wurde das trimere Transmembranprotein Influenza Hämagglutinin (HA) in MDCK GH-DAF-Zellen exprimiert.

Die Zellen wurden gleichzeitig mit einem monoklonalen Anti-HA mAb und einem polyklonalen Anti-GH Ab bei 4 °C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern. Eine Mikroskopanalyse zeigte ein Copatching von HA und GH-DAF in der Hauptzahl der Zellen (60 % Copatching, 35 % teilweise Überlappung und 5 % zufällige Verteilung) (Figur 9A-F). Wenn die Zellen für 1 Stunde mit 100 μ M GM₁ vor dem Antikörper-induzierten Quervernetzen inkubiert wurden, wurde in den meisten Zellen nur ein partielles Coclustern von HA und GH-DAF beobachtet (31 % Coclustern, 50 % teilweise Überlappung und 19 % zufällige Verteilung) (Figur 9 G-L). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anziehungskräfte zwischen Patches von HA und GH-DAF durch Verabreichung von Gangliosiden gestört werden, was zeigt, dass GPI-APs aus den Lipidmikrodomänen verdrängt werden.

Beispiel 9

Experimentelle Vorgehensweisen

In den vorstehenden Beispielen wurden die folgenden Vorgehensweisen verwendet:

Insertion von Lipiden, Verringerung des Cholesteringehalts und Octylglukosidbehandlung von Zellen:

Vorratslösungen von Rinderhirngangliosiden (bbG) oder GM₁ (1 - 10 mM) wurden in PBS hergestellt. Die Zellen wurden mit 10 - 100 μ M Gangliosiden in DMEM für 1 Stunde bei 37°C beladen (Masserini et al., Biochemistry 29 (1990), 697 - 701; Saqr et al., J. Neurochem. 61 (1993), 395 - 411). Um

überschüssiges Lipid zu entfernen, wurden Zellen gründlich mit PBS gewaschen, das 2 mg/ml entfettetes BSA (PBS/BSA) enthielt. Eine ethanolische 0,5 %ige Vorratslösung von 2-(6-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexanoyl-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (NBD-C₆-HPC) wurde unter heftigem Vortexen in PBS injiziert, um eine 1 mM Lösung zu ergeben. Die Insertion von NBD-C₆-HPC in Membranen wurde mit 10 - 100 µM NBD-C₆-HPC für 1 Stunde bei 8°C durchgeführt. Um MDCK GH-DAF-Zellen von Cholesterin zu befreien, wurden sie für 1 Stunde bei 37°C mit 10 mM Methyl-β-cyclodextrin (CD) inkubiert. Für die Octylglukosidbehandlung wurden MDCK GH-DAF-Zellen für 1 Stunde bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen an in DMEM gelöstem Octylglukosid inkubiert.

Detergenzextraktion:

Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml TX-114-Lysepuffer bei 4°C für 30 Minuten extrahiert. Die Zellen wurden abgeschabt und Proben für 30 Minuten bei 15.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde entfernt, das Pellet (unlösliche Fraktion) wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Lösliche und unlösliche Fraktionen wurden mit 10 % TCA für 1 Stunde auf Eis präzipitiert und für 15 Minuten mit 15.000 g bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden mit Aceton (-20°C) gewaschen und mit SDS-PAGE und Western Blotting weiter verarbeitet.

Quervernetzen, Elektrophorese und Western Blotting:

Das Quervernetzungsprotokoll wurde, wie kürzlich beschrieben, verwendet (Friedrichson et al., Nature 394 (1998), 802 - 805). Kurz, Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Das Quervernetzen wurde mit 0,5 mM BS³ für 45 Minuten bei 4°C durchgeführt. Nicht umgesetzter Quervernetzter wurde mit 50 mM Glycin für 15 Minuten bei 4°C gequentscht. Die Zellen wurden 20 Minuten bei 4°C und 10 Minuten bei 37°C in einem TX-114-Lysepuffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X-114 und Proteaseinhibitoren) lysiert. Die Lysate wurden kurz auf

Eis gekühlt und durch eine 15minütige Zentrifugation bei 15.000 g geklärt. Die Überstände wurden einer temperaturinduzierten Phasenseparation für 5 Minuten bei 37°C unterzogen. Wässrige und Detergenz-angereicherte Phasen wurden durch Zentrifugation für 3 Minuten mit 13.000 U/min bei Raumtemperatur (RT) getrennt. Die wässrigen Phasen wurden verworfen und 0,9 ml TX-114 Waschpuffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,06 % Triton-X-114 und Proteaseinhibitoren) wurden den Detergenzphasen zugegeben. Nach einer 15minütigen Zentrifugation mit 15.000 g bei 4°C wurden die Proben einer weiteren Phasenseparation unterzogen. Schließlich wurden die Detergenzphasen mit kaltem Aceton (-20°C) präzipitiert und bei 95°C für 5 Minuten in einem Lämmli-Probepuffer gekocht. Die Proteine wurden mit einer 5 - 15 % SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose überführt. Polyklonale Antikörper gegen GH und den Folatrezeptor gefolgt von den entsprechenden sekundären Antikörpern und ECL wurden verwendet, um GH-DAF und FR-GPI nachzuweisen. Immunreaktive Banden wurden durch densitometrisches Scannen von Filmen oder einen Lumineszenz-Image-Analysator LAS-1000 (Fujifilm, Deutschland) quantifiziert. Die Daten für jede Bedingung wurden gemittelt und die Veränderung als Standardabweichung ausgedrückt. Die Experimente wurden 3 bis 6 mal durchgeführt. Für einige Gelen wurden die entsprechenden Röntgenstrahlfilme unter Verwendung einer Fotoshop-Software gescannt und die optische Dichte der immunoreaktiven Banden wurde bestimmt und unter Verwendung von MacBas (Version 2.0) ausgedruckt.

Immunofluoreszenz:

Auf Deckgläsern gezüchtete Zellen wurden 3 mal mit PBS gewaschen und für 6 Minuten mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS bei 8°C und für 10 Minuten mit Methanol bei -20°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Anti-GH-Antikörper in PBS inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit Cy3-konjugiertem Anti-Schaf-IgG für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach jeder der obigen Inkubationen

wurden drei Waschschriffe mit PBS durchgeföhrt. Die Deckgläser wurden in Moviol eingebettet und es wurden Abbildungen mit einer hochauflösenden Digitalkamera C 4742-95 (Hamamatsu Photonics K.K., Japan) aufgenommen und die digitale Dekonvolution wurde unter Verwendung der digitalen konfokalen Routine Openlab (Version 1.7.7) (Improvision, UK) durchgeföhrt.

Für die Antikörper-induzierten Quervernetzungsexperimente wurden der Anti-GH-Antikörper und das Cy3-konjugierte Anti-Schaf-IgG in DMEM verdünnt. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 37°C mit dem Anti-GH-Antikörper inkubiert, mit DMEM gewaschen und für 20 Minuten bei 37°C mit Cy3-konjugiertem Anti-Schaf-IgG inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und wie oben beschrieben in Moviol eingebettet.

In-Gel-Proteinkinase-Assay:

In Schalen mit 6 Vertiefungen gezüchtete Zellen wurden mit Gangliosiden beladen oder mit BS³, wie oben beschrieben, quervernetzt, auf Eis geköhlt, 3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 400 µl Lysepuffer (20 mM Tris-Acetat, pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 10 mM β-Glycerophosphat, 50 mM Natriumfluorid, 5 mM Natriumpyrophosphat, 1 % TX-100, 1 mM Benzamidin, 2 µg/ml Leupeptin, 0,1 % β-Mercaptoethanol, 0,27 M Sucrose und 0,2 mM PMSF) für 30 Minuten bei 4°C lysiert und mit einem Gummiwischer abgekratzt. Die Lysate wurden für 15 Minuten bei 15.000 g geklärt und Aliquots wurden mit 5 x Probepuffer für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Die Proben wurden auf 5 - 15 % Gelen, die mit 5 mg/ml BSA polymerisiert waren, aufgetrennt. Der In-Gel-Proteinkinase-Assay wurde gemäß dem von van Dam beschriebenen Verfahren durchgeföhrt (van Dam et al., EMBO J. 14 (1995), 1798 - 1811), außer dass 65 µCi γ-³²P-ATP in 3 ml Puffer K pro Gel verwendet wurden.

Virale Infektion und Antikörper-induziertes Patching:

Für eine Infektion mit dem HA-Influenza-Virus wurde das Virus in einem Infektionsmedium (MEM, 50 mM Hepes, pH 7,3, Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml), 0,2 % BSA) verdünnt und es wurde für 1 Stunde eine Virusadsorption durchgeführt. Die Infektion wurde weitere 2,5 Stunden fortgesetzt. 100 µM GM₁, verdünnt in DMEM, wurden zu einigen Zellen während der letzten Stunde zugegeben. Für ein Antikörper-induziertes Patching von HA und GH-DAF wurden die Zellen mit einem polyklonalen Anti-GH-Antikörper und einem monoklonalen Anti-HA-PR8 (H17L10), verdünnt 1:3000 bzw. 1:50 in DMEM inkubiert. Die Inkubation wurde für 1 Stunde bei 4 °C durchgeführt. Nach einem kurzen Waschen mit PBS/0,2 % BSA wurden die Zellen mit den entsprechenden FITC und Cy-3-gekoppelten sekundären Antikörpern für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden fixiert, eingebettet und Abbildungen wie oben beschrieben genommen. Für die Quantifizierung wurden 60 zufällig ausgewählte Zellen aus zwei verschiedenen Experimenten als digitale Abbildungen gespeichert. Die Zellen wurden in drei verschiedene Kategorien gemäß dem Ausmaß der Überlappung zwischen den Patches eingeteilt: (1) Coclustern (mehr als 70 % Überlappung); (2) teilweises Coclustern; (3) zufällige Verteilung.

Patentansprüche

1. Verwendung von Gangliosiden zur Herstellung eines Mittels zur Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen.
- 5 2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Mittel die Lokalisierung von Proteinen auf den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen beeinflusst.
- 10 3. Verwendung nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Mittel die Lokalisierung von Ankerproteinen, acylierten Proteinen, Src-Kinasen oder/und Cholesterin-verankerten Proteinen beeinflusst.
- 15 4. Verwendung nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass Mittel auf Glykosyl-Phosphatidylinositol-Ankerproteine, Kinasen der Familie Src, Influenza Virus Hämagglutinin oder/und Caveolin-1 in der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomäne wirkt.
- 20 5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Mittel einen Clusterabbau der Proteine bewirkt.
- 25 6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Gangliosid ausgewählt wird aus Rinderhirngangliosiden, GM₁, GD1a, GD1b, GD3, GM2, GM3, GQ1a, GQ1b oder/und Globosiden.
- 30

7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Modulation der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen eine Veränderung der Membrantransport-, Signalübertragungs- und/oder Zelladhäsionseigenschaften oder/und von enzymatischen Prozessen bewirkt.

5

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Modulation der Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen eine Veränderung der Proteolyse des Amyloidvorläuferproteins der Alzheimer Erkrankung oder eine Modifikation eines Prionproteins bewirkt.

10

9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

dass das Mittel als Therapeutikum eingesetzt wird.

15

10. Verwendung nach Anspruch 10,

dadurch gekennzeichnet,

dass das Mittel in einer Dosis von 3 mg bis 30 mg pro kg pro Tag verabreicht wird.

20

11. Verwendung von Gangliosiden zur Modulation von Shingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen.

25

12. Verfahren zur Modulation von Shingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen, wobei einem Patienten Ganglioside in einer Dosis von 3 mg bis 30 mg pro kg pro Tag verabreicht werden.

30

Zusammenfassung

Es wird die Verwendung von Gangliosiden zur Herstellung eines Mittels zur
5 Modulation von Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen beschrieben.

wr/ANM/20597PDE 28. September 1999

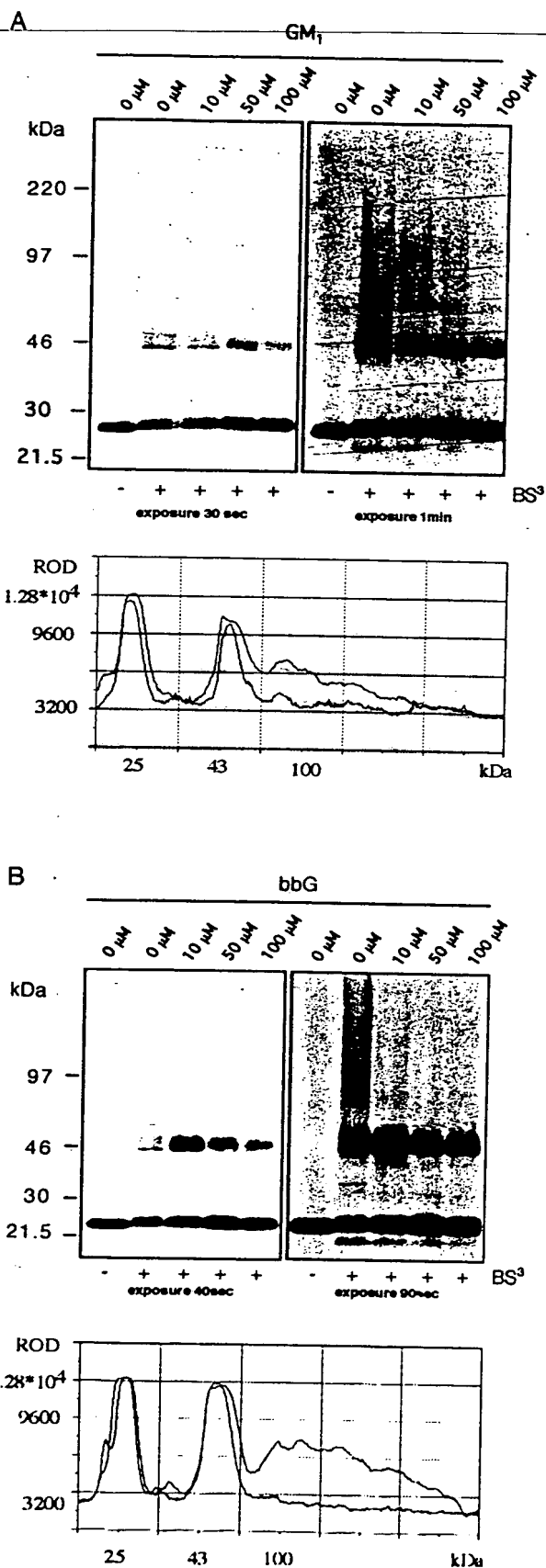
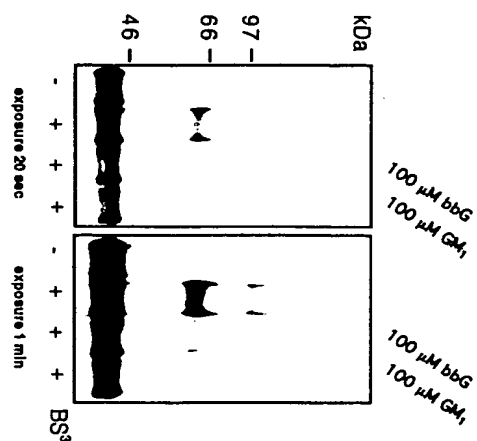
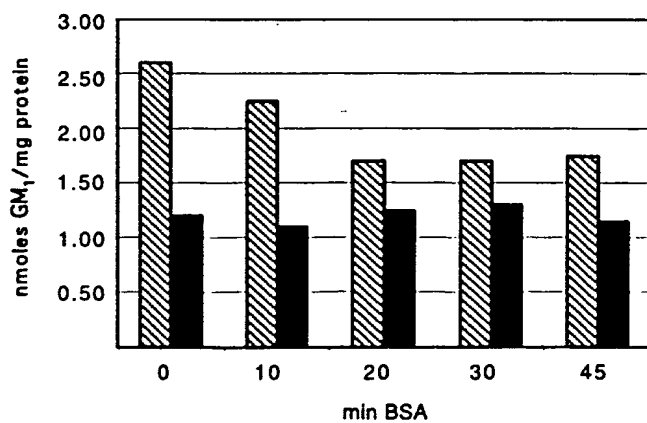


Fig. 1

Fig. 2



A



B

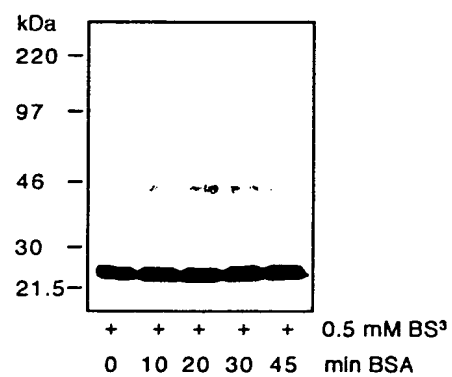


Fig. 3



Fig. 4

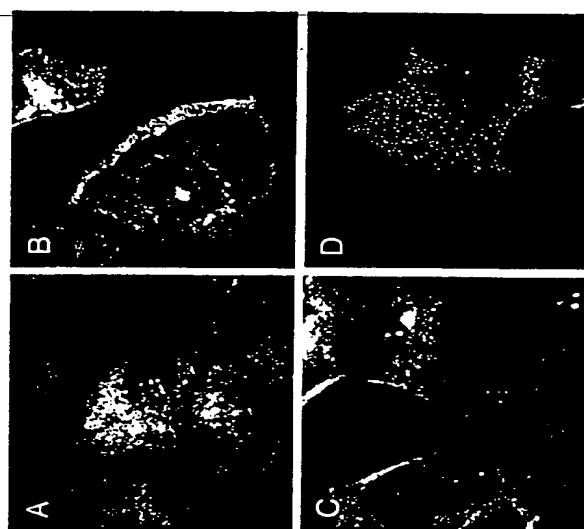


Fig. 7

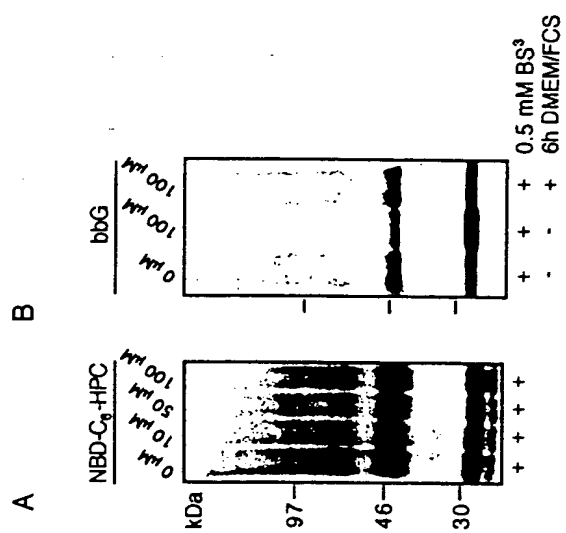


Fig. 6

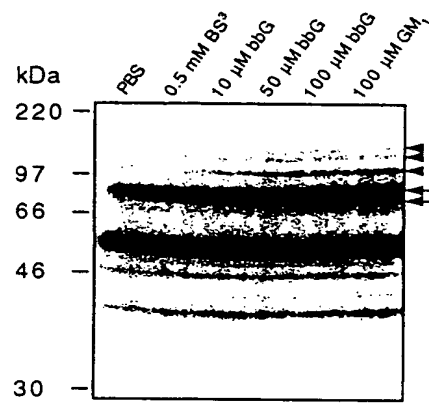


Fig. 8

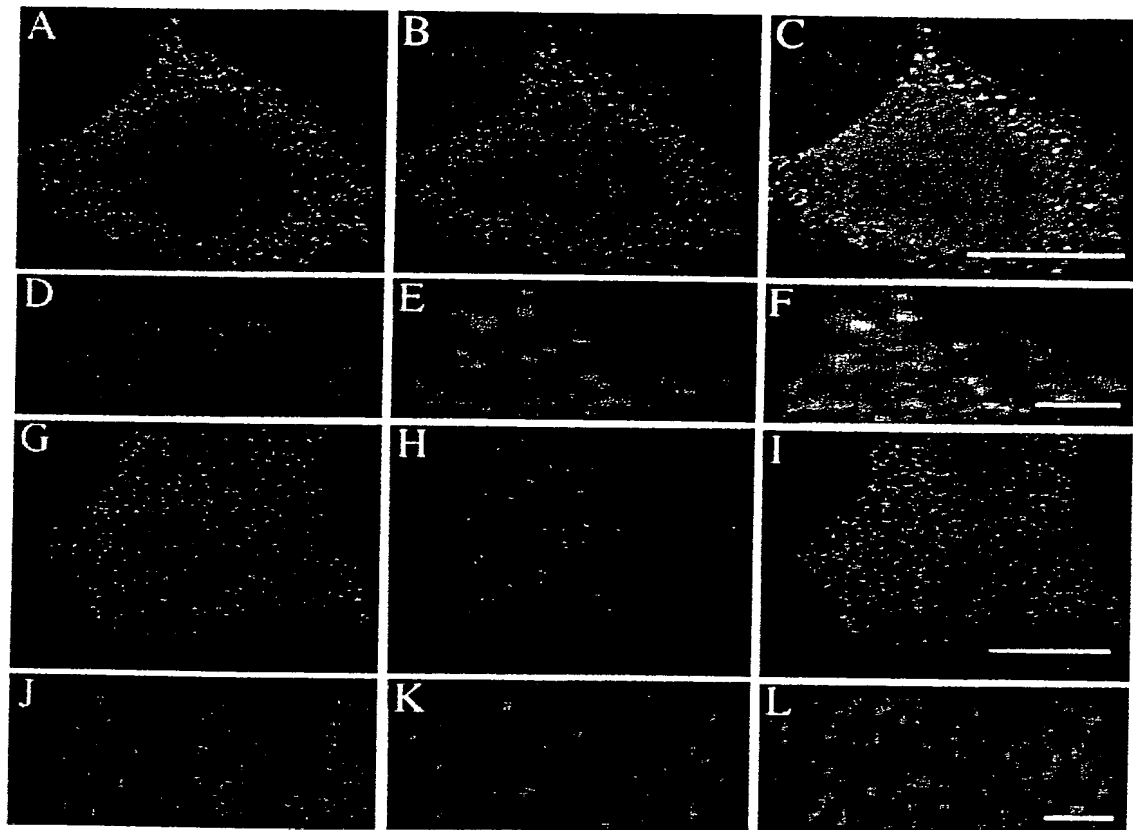


Fig. 9

